

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-58733

(P2002-58733A)

(43) 公開日 平成14年2月26日 (2002.2.26)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 L 15/16		A 6 1 L 2/08	4 C 0 5 8
	2/08	15/01	4 C 0 8 1

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2001-142179(P2001-142179)	(71) 出願人	588010953 ジョンソン・アンド・ジョンソン・メディカル・リミテッド Johnson & Johnson Medical Ltd. イギリス国、エジンバラ・イーエイチ2・4エヌエイチ、クイーン・ストリート・68-73、アースカイン・ハウス
(22) 出願日	平成13年5月11日 (2001.5.11)	(74) 代理人	100066474 弁理士 田澤 博昭 (外1名)
(31) 優先権主張番号	570105		
(32) 優先日	平成12年5月12日 (2000.5.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凍結乾燥処理した複合材料およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 無菌の凍結乾燥処理したスポンジを提供する。

【解決手段】 本発明によるスポンジの少なくとも80重量%は60:40乃至40:60の重量比率におけるコラーゲンおよび酸化再生セルロースによってのみ構成されており、当該スポンジは3ニュートン以上の乾燥時引張強度および/または1ニュートン以上の湿潤時引張強度を有している。好ましくは、上記コラーゲンは20%以下の変性の程度を有しており、本発明のスポンジは化学的架橋部分を実質的に含まない。さらに、本発明は上記の本発明によるスポンジの製造方法を提供する。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 無菌の凍結乾燥処理したスポンジにおいて、当該スポンジの少なくとも80重量%が60：40乃至40：60の重量比率におけるコラーゲンおよび酸化再生セルロースの混合物によってのみ構成されており、当該スポンジが3ニュートン以上の本明細書において定めるような乾燥時引張強度を有しているスポンジ。

【請求項2】 無菌の凍結乾燥処理したスポンジにおいて、当該スポンジの少なくとも80重量%が60：40乃至40：60の重量比率におけるコラーゲンおよび酸化再生セルロースの混合物によってのみ構成されており、当該スポンジが1ニュートン以上の本明細書において定めるような湿潤時引張強度を有しているスポンジ。

【請求項3】 凍結乾燥処理したスポンジ・パッドの製造方法において、

コラーゲンが10%以下で変性している精製コラーゲン繊維の酸性化ペーストを供給する工程と、

繊維の少なくとも80%が20 $\mu$ m乃至1000 $\mu$ mの範囲内の長さを有している酸化再生セルロース繊維を供給する工程と、

前記コラーゲンおよび前記酸化再生セルロース繊維を60：40乃至40：60のコラーゲン：酸化再生セルロース繊維の重量比率で均質な水性分散液内において混合する工程とを備えており、当該水性分散液が2.8乃至3.2の範囲内のpH値に酸性化されて、全体で0.8重量%乃至1.2重量%の固形物濃度を有しており、さらに、

前記水性分散液を1cm以上の深さでトレイ内に注ぐ工程と、

前記水性分散液を-30℃以下の温度に凍結させた後に、5重量%乃至15重量%の最終の水分含有率まで温度プログラム制御した凍結乾燥処理および熱的脱水架橋処理を行なう工程と、

前記凍結乾燥処理した分散液を分割して表面層を除去すると共に1個以上のパッドを形成する工程と、

前記1個以上のパッドをガンマ線照射により滅菌処理する工程とを備えている方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はコラーゲンおよび酸化再生セルロース（ORC）の混合物を主要部分として含む凍結乾燥処理したパッド、および当該パッドの製造方法に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】 PCT国際公開第WO 98/00180号は慢性傷治療用の酸化再生セルロース（ORC）にコラーゲンを添加混合した凍結乾燥処理したスポンジの使用について記載している。このようなスポンジは実用において純度、滅菌度および非抗原性に関する厳しい要求を満たす必要がある。

##### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 高い再現性および湿潤時および乾燥時の両方において高い引張強度を示すコラーゲン/ORC混合物のスポンジを提供することはこれまで不可能であった。特に、コラーゲンはガンマ線照射により滅菌処理されると変性しやすい。さらに、コラーゲン・スポンジは傷流体、特にコラーゲナーゼ酵素の存在下において、かなり速く分解しやすい。この問題はグルタルアルデヒドのような架橋剤によるコラーゲン・スポンジの化学的架橋処理により解消可能であるが、このような架橋剤の使用により毒性および抗原性の問題が生じるおそれがある。

##### 【0004】

【課題を解決するための手段】 従って、本発明の目的は高い引張強度を示すコラーゲン/ORC混合物に基づく生理学的に許容可能な無菌スポンジ・パッドを提供することである。

【0005】 本発明の別の目的は極めて高い純度および滅菌度、および極めて低い生物担持性（bioburden）を有するコラーゲン/ORC混合物に基づく生理学的に許容可能な無菌スポンジ・パッドを提供することである。

【0006】 本発明の別の目的は高い均一性を有するコラーゲン/ORC混合物に基づく生理学的に許容可能な無菌スポンジ・パッドを提供することである。

【0007】 本発明の別の目的は模擬的な生理学的諸条件下において減少した吸収速度を示すコラーゲン/ORC混合物に基づく生理学的に許容可能な無菌スポンジ・パッドを提供することである。

【0008】 本発明の別の目的は化学的架橋処理を行なうことなく高い機械的強度および長い吸収時間を示すコラーゲン/ORC混合物に基づく生理学的に許容可能な無菌スポンジ・パッドを提供することである。

【0009】 本発明は無菌の凍結乾燥処理したスポンジを提供し、当該スポンジの少なくとも80重量%は60：40乃至40：60の重量比率におけるコラーゲンおよび酸化再生セルロースの混合物によってのみ構成されており、当該スポンジは、本明細書において決定しているように、3ニュートン（N）よりも高い乾燥時引張強度を有している。

【0010】 上記の凍結乾燥処理したスポンジは無菌である。好ましくは、この滅菌度の保証値は10<sup>-6</sup>よりも優れている。好ましくは、このスポンジはガンマ線照射により滅菌処理されている。

【0011】 上記のスポンジは少なくとも80重量%の60：40乃至40：60の重量比率におけるコラーゲンおよびORCの混合物を含有している。好ましくは、この重量比率は50：50乃至40：60のORC：コラーゲンの範囲内で僅かに過剰のコラーゲンを含む。好ましくは、上記の凍結乾燥処理したスポンジはコラーゲン、ORC、水、および5%までの1種類以上の成長因

子のような治療学的に活性な物質により実質的に構成されている。好ましくは、上記の凍結乾燥処理したスポンジはコラーゲン、ORCおよび水以外の成分を1重量%以下で含有している。

【0012】コラーゲンの含有率はこのコラーゲンをその成分アミノ酸に加水分解して後に詳述するようにヒドロキシプロリンについて分析することにより決定される。このコラーゲン含有率はヒドロキシプロリン含有率の7、19倍であると計算されている。一方、ORC含有率はこのORCをその成分単糖類に加水分解して後に詳述するようにグルクロン酸について分析することにより決定される。

【0013】好ましくは、上記の凍結乾燥処理したスポンジは、以下に説明するように測定した場合に、2、3乃至4、0、さらに好ましくは2、5乃至3、0のpH値を有している。

【0014】好ましくは、本発明による無菌の凍結乾燥処理したスポンジは、後に説明するように測定した場合に、15%以下、さらに好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下の程度のコラーゲン変性を含む。このようにコラーゲンが滅菌処理において使用するガンマ線照射による変性に対して安定であることは本発明による凍結乾燥処理したスポンジの特に有利な特徴である。このコラーゲンの変性の程度は変性したコラーゲンを溶解するためのトリプシンによる処理（トリプシンは天然コラーゲンを溶解しない）、およびこれに続く濾過および以下に詳述するような濾液内のヒドロキシプロリンの定量により決定される。

【0015】好ましくは、本発明による無菌の凍結乾燥処理したスポンジは3ニュートン以上、さらに好ましくは4ニュートン以上の乾燥時引張強度（以下に説明するように測定した場合の最大負荷）を有している。好ましくは、以下に説明するように測定した場合の、20%延伸時における乾燥時引張強度の負荷は2、5ニュートン以上、さらに好ましくは3、5ニュートン以上である。好ましくは、以下に説明するように測定した場合の、乾燥時破断点伸びは15%乃至30%、さらに好ましくは20%乃至25%である。

【0016】本発明によるスポンジの引張強度特性は試験前にPBS（リン酸塩バッファー化塩類溶液）中に15分間浸漬したサンプルについての湿潤時強度測定によりさらに特徴付けられる。好ましくは、この結果として得られる湿潤時強度の最大負荷は1ニュートン以上、さらに好ましくは1、25ニュートン以上である。また、20%延伸時における湿潤時負荷は0、1ニュートン以上、好ましくは0、2ニュートン以上、最も好ましくは0、2ニュートン乃至0、3ニュートンである。さらに、湿潤時破断点伸びは好ましくは75%乃至100%、さらに好ましくは80%乃至90%である。

【0017】好ましくは、本発明による無菌の凍結乾燥

処理したスポンジは化学的に架橋処理されていない。本発明によるスポンジは凍結乾燥処理の結果としての部分的な熱的脱水架橋処理（dehydrothermal cross-linking）の作用を受ける可能性があるが、グルタルアルデヒド等による化学的架橋処理の作用が全く存在していないことが好ましい。このことにより、スポンジの抗原性および処理コストが減少できる。本発明はスポンジの組成および製造条件を極めて慎重に制御することによりスポンジの十分な物理的特性およびイン・ビボにおける十分に長い吸収時間を達成する。特に、上記のスポンジはORC繊維を含有していることが好ましく、この場合に、その繊維の少なくとも80容量%は20 $\mu$ m乃至1000 $\mu$ mの範囲内の長さを有している。このような寸法分布は、例えば、ORC布を微粉砕した後に、この粉砕したパウダーを篩分けして上記の範囲外の繊維を除去することにより達成できる。好ましくは、このORC繊維の長さの平均値（容量平均値）は250 $\mu$ m乃至450 $\mu$ mの範囲内である。

【0018】上記の範囲内のORC繊維の長さの選択により、このORCとコラーゲンとの容易な混合が行なえて高い均質性の製品が得られる。このようにORCがコラーゲンに対してより完全に複合化できることにより、スポンジの治療学的特性が改善できる。さらに、このようなORCは滅菌処理中のガンマ線照射によるコラーゲンの変性を減少するのにさらに効果的に作用する。特に注目すべきことは、上記のようなORC繊維の小さい寸法にも拘わらず、スポンジの引張強度を維持しながらこれらの利点が達成できることである。

【0019】さらに、本発明による凍結乾燥処理したスポンジの所望な物理化学的特性はコラーゲン繊維を実質的に変性させずにコラーゲンを精製するために連続的なアルカリおよび酸の処理工程を通して処理したコラーゲンを使用することにより達成できる。好ましくは、本発明による凍結乾燥処理したスポンジの生物担特性（TVC（全生存細胞数））は100cfu（コロニー形成単位）/g以下、さらに好ましくは10cfu/g以下、最も好ましくは1cfu/g以下である。

【0020】本発明による無菌の凍結乾燥処理したスポンジは高くて均一な多孔性および高い液体吸収性を有している。0、9%塩類溶液中における上記の無圧縮状態のベッドについて測定される吸収性は12g/100cm<sup>2</sup>であるのが好ましく、15g/100cm<sup>2</sup>であればさらに好ましい。

【0021】好ましくは、本発明の無菌の凍結乾燥処理したスポンジは以下に詳述するような模擬的な生理学的条件下において48時間よりも長い吸収時間を有している。

【0022】さらに、本発明は、コラーゲンが10%以下で変性している精製コラーゲン繊維の酸性化ペーストを供給する工程と、少なくとも80%の繊維が20 $\mu$ m

乃至1000 $\mu$ mの範囲内の長さを有している酸化再生セルロース繊維を供給する工程と、上記コラーゲンおよび上記ORC繊維を60:40乃至40:60のコラーゲン:ORCの重量比率で均質な水性分散液内において混合する工程とを備えており、当該水性分散液が2.8乃至3.2の範囲内のpH値に酸性化されて、全体で0.6重量%乃至1.2重量%の固形物濃度を有しており、さらに、上記水性分散液を1cm以上の深さでトレイ内に注ぐ工程と、分散液を-30℃以下の温度に凍結させた後に、5重量%乃至15重量%の最終の水分含有率まで温度プログラム制御した凍結乾燥処理および熱的脱水架橋処理を行なう工程と、凍結乾燥処理した分散液を分割して表面層を除去すると共に1個以上のパッドを形成する工程と、上記の1個以上のパッドをガンマ線照射により滅菌処理する工程とを備えている凍結乾燥処理したスポンジ・パッドの製造方法を提供する。

【0023】好ましくは、本発明による方法はあらゆる化学的架橋剤を実質的に使用することなく実行される。

【0024】好ましくは、上記のコラーゲンを供給する工程は、ウシの真皮の新鮮で無膨張状態の分離物を供給する工程と、上記の真皮分離物を水酸化ナトリウムおよび過酸化水素を含有する溶液により処理して当該真皮を膨張させて滅菌処理する工程と、上記の真皮を10日乃至14日の期間にわたり12以上のpH値および50℃以下の温度において水性アルカリ溶液により処理する工程と、上記の真皮分離物のpH値が2.5以下に下がるまで0.8乃至1.2のpH値および50℃以下の温度において水性酸溶液により当該真皮を処理する工程と、上記の真皮を洗浄して、当該真皮を十分な水と共に粉碎してペーストを形成する工程とを備えている。

【0025】上記の処理により、コラーゲンを著しく変性させることなく極めて高い純度および均一性のコラーゲンを得ることができる。上記のコラーゲン・ペーストは凍結状態で保存可能であるが、上記の各工程とコラーゲンをORCに混合する工程との間においてコラーゲンを凍結乾燥処理しない方が好ましい。

【0026】好ましくは、上記の酸化再生セルロース繊維を供給する工程は酸化再生セルロースの布を微粉碎してその微粉碎した粒子をスクリーニングすることにより20 $\mu$ m以下または1000 $\mu$ m以上の粒径を有する粒子を除去する工程を備えている。

【0027】好ましくは、上記のコラーゲンおよびORCを分散させる工程は、酸膨張処理したコラーゲン/水のペーストを酸性化した水に添加する工程と、酸化再生セルロース繊維を上記の酸性化した水に添加する工程と、得られた混合物を均質化する工程とを備えている。

【0028】

【発明の実施の形態】上記の分散液を少なくとも10mm、好ましくは少なくとも20mmの深さまでトレイの中に注ぎ入れて、凍結乾燥処理の前にトレイ内において

ブロック状に凍らせた。この凍結処理は-55℃に予備冷却した棚の上に上記のスラリーを入れたトレイを置くことにより行った。その後、このトレイを-50℃で2時間維持した後に、凍結乾燥工程を開始するまで-40℃に維持した凍結乾燥装置の中で保持した。この凍結処理方法により、さらに均一に分布した氷の結晶が得られ、トレイ内のスラリーを単純に噴射凍結処理するよりも、さらに均一な製品が得られる。

【0029】上記の凍結乾燥工程は-40℃乃至+30℃の範囲内の温度プログラムによる熱的脱水架橋処理を伴って行うことにより凍結乾燥した材料のブロックを得ることが好ましい。さらに、これらのブロックを分割して表面層を除去すると共に1個以上のパッドを形成する。上記のコラーゲンおよびORC繊維をトレイに入れることにより最終的なパッド内の所望のコラーゲンおよびORC繊維の配向が得られる。さらに、比較的大きなブロックから最終的なパッドを分割することにより、これらが確実に高い均質性および表面の均一性を有することができる。

【0030】好ましくは、上記の滅菌処理工程は18KGy（キログレイ）乃至29KGyの照射線量のガンマ線照射により行われる。この滅菌処理工程において著しく少ないコラーゲンの変性が生じることが分かっており、これはORCの安定化作用によるものと考えられる。

【0031】本発明による方法の好ましい実施形態において、酸化再生セルロースに対するコラーゲンの重量比率は50:50乃至55:45であり、水性分散液のpH値は2.9乃至3.1である。

【0032】以下、本発明による方法および製品の特定の実施形態を例示的に説明する。

#### 【0033】実施例1

凍結乾燥処理したコラーゲン/ORCスポンジを以下のように作成する。

【0034】まず、コラーゲン成分を以下のようにウシの真皮から作成する。すなわち、ウシの真皮を牛皮から分離し、削り取って次亜塩素酸ナトリウム溶液（0.03%重量/容積）に浸漬してその後の処理における微生物活性の影響を阻止する。

【0035】その後、上記の真皮を水で洗浄し、水酸化ナトリウム（0.2%重量/容積）および過酸化水素（0.02%重量/容積）を含有する溶液により処理して、この真皮を周囲温度において膨張および滅菌処理する。

【0036】次に、この真皮分離物を、アミド窒素量が0.24mmol（ミリモル）/gに到達するまで、回転（tumbling）を伴う10日乃至14日の期間にわたる周囲温度で12.2以上のpH値の水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、および炭酸水素ナトリウム（それぞれ、0.4%重量/容積、0.6%重量/容積、および

0.05%重量/容積)を含有する溶液中におけるアルカリ処理工程において処理する。

【0037】その後、上記の真皮分離物を周囲温度およびpH0.8乃至1.2における1%塩酸による酸処理工程において処理する。真皮分離物が十分な酸を吸収してpH値が2.5以下になるまでこの処理を運転しながら継続する。その後、真皮分離物のpH値が3.0乃至3.4に到達するまで各分離物を水で洗浄する。

【0038】その後、真皮分離物を最初は粗い粉砕処理の設定でその後微細な粉砕処理の設定によりボール・チャップパー内において水と共に粉砕する。この結果、100gの水としての水に対して650gの真皮分離物の比率で作成したペーストを凍結して次の処理段階において使用するまで保存した。しかしながら、次の段階でORCに対して添加混合する前においては、コラーゲンは凍結乾燥処理しない。

【0039】凍結乾燥処理したパッドのORC成分を以下のように作成する。温度を60℃以下に維持しながら、SURGICEL布(Johnson & Johnson Medical社、アーリントン)をスクリーン・プレートを通してながらロータリー・ナイフ・カッターにより微粉砕する。

【0040】その後、微粉砕したORCパウダーおよび必要量の(固形物含有量による)凍結したコラーゲン・ペーストを酢酸により酸性化した十分な量の水に添加して3.0のpH値および全体の固形物含有量を1.0%にした。この混合物をPrymaMZ1300ホモジナイザーにより均質化して凝固物を積極的に減少することにより均質なスラリーを形成する。このスラリーのpH値を2.9乃至3.1に維持する。また、スラリーの温度を20℃以下に維持し、固形物含有量を1±0.07%に維持する。

【0041】得られたスラリーをガス抜き用容器にポンプ供給する。真空処理を開始して攪拌を断続的に行いながら少なくとも30分間スラリーのガス抜きを行なう。このスラリーを25mmの深さまで凍結乾燥用トレイの中にポンプ供給する。このトレイを温度を予め-40℃に設定したフリーザーの棚に載置する。その後、凍結乾燥プログラムを開始してコラーゲンおよびORCの乾燥および熱的脱水架橋処理を行なって厚いスポンジ・パッドを形成する。

【0042】上記の工程が完了した時点で真空状態を解除し、凍結乾燥処理した各ブロックを取り出して、分割処理を行なって上部および下部の表面層を除去し、各ブロックの残りの部分を3mm厚のパッドに分割する。この凍結乾燥処理した各ブロックをパッドに分割する工程はPecken Kirfel K1スリッターにより行なう。

【0043】その後、各パッドをダイ・カッター上において所望の寸法および形状にダイ切断し、包装して、18KGy乃至29KGyのコバルト60ーガンマ線照射処理により滅菌処理する。この場合に特に注目すべきこ

とは、上記の照射処理がコラーゲンの著しい変性を生じないことであり、コラーゲンがORCの存在により安定化されていると考えられる。

【0044】得られた凍結乾燥処理したコラーゲン/ORCパッドは均一な白色のビロードのような外観を有している。これらのパッドの厚さは3.2±0.17mm(N=8パッチ)である。コラーゲン含有率は54±3.8%(N=12パッチ)である。ヒドロキシプロリン含有率は7.6±0.5%(N=12パッチ)である。カルボキシレート含有率は10.98±0.81%(N=12パッチ)である。灰分量は0.16±0.1%(N=12パッチ)である。重金属(鉛)含有率は1ppm以下である。pH値は2.78±0.15である。変性率は4.87±1.54%である。内毒素量は33.5±0.9cfu/gである。生物担持量は0.2±0.3cfu/gである。さらに、水分含有率(乾燥時における損失)は12.0±12.8%である。

#### 【0045】処理1

本発明による材料のコラーゲン含有量は以下のように測定する。

【0046】コラーゲンを各成分アミノ酸に加水分解する。次に、アミノ酸のヒドロキシプロリンの量をクロラミンTにより酸化した後に4-ジメチルアミノ・ベンズアルデヒドによりカップリングして着色生成物を生成することにより決定し、この濃度を550ナノメートルにおける吸光分光分析により測定する。

【0047】各サンプル(試料)の加水分解は消化が完了するまで105℃において6モル塩酸により行ない、この処理は少なくとも16時間かかる。次に、この溶液を6モル水酸化ナトリウム溶液によりpH6に中和する。その後、この溶液を希釈する。一般に、10mgのサンプルに対して、この処理では1mlの6モル塩酸を使用し、希釈時の分析物の最終容積は500mlである。

【0048】上記試験溶液の1.0mlサンプルを7mgのクロラミンTを600mlのクエン酸塩バッファー中に溶解することにより作成した酸化体溶液の1.0mlにより処理する。この混合物を10分間放置した後、1.0mlの20%過塩素酸を添加混合して、室温で5分間放置する。

【0049】その後、この混合物を30mgの4-ジメチルアミノ・ベンズアルデヒドを45mlの過塩素酸(60%重量/容積)に溶かした後に250mlのプロパン-2-オール中に希釈することにより作成した着色試薬の1.0mlにより処理する。次に、この混合物を60℃で20分間水中で処理し、5分間冷却した後、550ナノメートルにおける光学濃度を測定する。この光学濃度を種々の濃度における純粋なコラーゲン、種々の濃度における純粋なヒドロキシプロリンの対照サンプル、およびブランクの対照サンプルにおいて測定し

た値に対して比較する。

【0050】重量%のサンプルのコラーゲン含有率を重量%の測定したヒドロキシプロリン含有率に7.19を掛けることにより算出した。

#### 【0051】処理2

本発明による材料中に存在する変性したコラーゲンの量は以下のように決定する。

【0052】天然のコラーゲンは特定のコラーゲンアーゼを除く蛋白分解酵素に対してその三重螺旋構造により保護されている。この螺旋構造が損傷すると、これにより生じる変性したコラーゲンがトリプシンのような別のプロテアーゼの影響を受けやすくなり、ペプチドに分解する。この過程において、耐トリプシン性の天然コラーゲンが分解したペプチドから塩析により分離されて、濾液中に存在する非天然コラーゲンがヒドロキシプロリン分析により定量される。

【0053】本発明による材料のサンプル(100mg)を秤量して50mlの円錐形フラスコの中に入れる。このフラスコに500単位のトリプシンを含有するトリス塩酸バッファー溶液の10mlを添加する。さらに、トリプシン酵素の無いブランク実験も行なった。これらの混合物を4℃で5時間振盪した。その後、3モル酢酸中における2.5%塩化ナトリウム溶液の2.5mlを各容器に加えて、完全に混合した。その後、これらの容器を冷蔵庫の中に入れて4℃で少なくとも16時間保存した。冷却した抽出物をWhatman 541フィルター・ペーパーを通して50mlビーカーの中に濾過し、この濾液サンプルのヒドロキシプロリン含有率を上記の処理1に記載した方法により測定する。変性コラーゲンは7.19×(測定したヒドロキシプロリン量)として計算され、変性コラーゲンの割合は処理1により測定した全体のコラーゲン含有率との比較により計算される。

#### 【0054】処理3

本発明による材料のORC含有率はAnalytical Chemistry第4巻(1962年)、第300頁乃至第334頁においてBlitzerおよびMairにより記載される方法と同様の方法により測定される。

【0055】すなわち、材料は硫酸により個々の成分に加水分解される。この加水分解時に、ORCはグルクロン酸(約80%)およびグルコース(20%)に分解する。その後、このグルクロン酸残基をカルバゾールによる着色反応にかけて、その吸光度を測定し、一連のORC標準値に対して比較することによりORC含有率の推定値を決める。

【0056】試験にかける材料の各サンプル(10mg)を加水分解用試験管の中に入れる。その後、脱イオン水(0.5ml)および濃硫酸(3ml)を添加し、この混合物を渦ミキサー(vortex mixer)で15分間混合して、サンプルの完全な溶解について調べた。

【0057】各サンプルの加水分解物の一部(0.1m

l)を2.9mlの四ホウ酸ナトリウム溶液(濃硫酸中で0.025モル)に添加して、渦ミキサーにより混合する。これらのサンプル試験管を沸騰している水槽中で10分間保持した後に冷却する。その後、0.1mlのカルバゾール溶液(エタノール中で0.125%)を各試験管に添加して渦ミキサーにより完全に混合した後、各試験管を沸騰している水槽中で15分間保持した後に冷却する。その後、523ナノメートルにおけるこれらの溶液の吸光度を測定し、ゼロ濃度ORCの標準値に対して比較した。

#### 【0058】処理4

本発明による材料中に存在するバクテリア、真菌類または酵母のような微生物の数は以下のように測定する。

【0059】上記材料の2mgのサンプルを100mlの無菌の1/4強度リンゲル溶液により抽出して、その一部(5ml)を無菌濾過処理用の無菌濾フィルター(孔径0.45μm)に通した。これらのフィルターをベトリ皿中の培養培地に載置し、30℃において48時間無菌条件下で培養して、肉眼または必要に応じて立体顕微鏡により計数可能な微生物コロニーの成長を可能にする。さらに、適当な対照ブランク実験を行なう。

【0060】各サンプルの微生物汚染量は以下の式に従う微生物当たりのコロニー形成単位(cfu/g)における全生存細胞数(TVC)として表現される。

$$TVC = [(N \times 100) / (5 \times W)]$$

この式において、Nはコロニーの数であり、Wはグラム単位のサンプル重量であり、100はml単位の抽出剤溶液の容積であり、5は濾過した一部分(5ml)の容積である。

#### 【0061】処理5

本発明による材料の湿潤時および乾燥時の引張強度は以下のように測定する。

【0062】各サンプルを上記材料の3mm厚のパッドからダイ切断する。このサンプル寸法は2.5×12cmである。次に、各サンプルをあご面寸法が50×25mmであるインストロン引張試験機の中に装填する。乾燥時引張強度を20%伸び時における負荷および破断点負荷として測定する。破断点伸びは初期的なあご分離の割合として表現される。少なくとも5個の試料を試験する。

【0063】湿潤時引張強度測定はリン酸塩バッファー処理化塩類溶液(PBS)中に15分間浸漬したサンプルについて同様に行なう。

#### 【0064】処理6

本発明による固形物材料のpH値は100mgの材料を100mlの脱イオン水に浸軟(macerating)して、ガラス電極で得られたスラリーのpH値を測定することにより測定される。

#### 【0065】処理7

本発明による複合材料の吸収速度は以下のように模擬的

な偽流体の流れの中において測定される。

【0066】厚さ3mmで直径6cmの被試験材料の円形パッドを円筒形の凹部の中に入れて、液体非通過性の支持材料の層により被覆する。模擬的な偽流体（リン酸塩バッファー化塩類溶液中における3.45mg/lのコラーゲンaze）を被試験円板における中心下方の開口部からこの被試験円板の下方で当該被試験円板の各端部周辺に放射状に配置された6個の開口部に向けて2.5ml/24時間、7.5ml/24時間、または12ml/24時間の速度で放射状にポンプ供給して、模擬的な低度、中程度、および高度の偽浸出流体の速度を作成した。吸収時間を被試験パッドの完全な溶解に要する時間として推定した。この時間は上記の高い流速の場合に少なくとも2日であり、中程度の流速の場合に少なくとも3日であり、低い流速の場合に少なくとも6日であった。

#### 【0067】処理8

本発明による材料の液体吸収性を以下のように測定した。

【0068】被試験材料のサンプル（一般的に2.5cm×2.5cm×0.3cm）を乾燥状態で秤量した後、リン酸塩バッファー化塩類溶液（PBS）中に15分間浸漬して、ピンセットにより取り出して再び秤量した。その後、液体吸収性を1グラム（乾燥時重量）の材料当たり吸収された液体のグラム数で計算した。

#### 【0069】処理9

本発明による材料中の内毒素量は以下のように決定する。

【0070】グラム陰性バクテリアの細胞壁からの内毒素はリムルスアモeba様細胞分解産物（LAL）をゲル中に生じる。この試験は予備設定した内毒素濃度を基準に判定してサンプルが試験に対して陽性または陰性であることを決定する制限試験として行われる。陽性および陰性の対照物が必要であり、簡単な試験を行なうことにより実施できる。この対照物の標準的内毒素は基準とされる標準的内毒素（USP-EC6）に対して照合された効力を有する。この方法についての詳細はCarl FreudenbergのMethod 091, 102（発熱性）、USP（米国薬局方）XXIII（1985年）、FDA Guidelines（1987年）、および欧州薬局方2.6.14（1998年）に記載されている。

【0071】上記実施例1の実施形態は例示のみのために説明した。当該技術分野における熟練者においては本発明の範囲に該当する多くの別の組成物および方法が明らかになる。

【0072】本発明の実施態様は以下の通りである。

（1）前記スポンジが化学的架橋部分を実質的に含まない請求項1に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

（2）前記コラーゲンが20%以下の変性度を有している請求項1に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

（3）前記コラーゲンが10%以下の変性度を有している請求項1に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

（4）前記酸化再生セルロース繊維の80容量%が20μm乃至1000μmの長さである実施態様（2）に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

（5）前記酸化再生セルロース繊維の平均の長さが250μm乃至450μmである実施態様（4）に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

【0073】（6）前記酸化再生セルロースが繊維の形態であり、当該繊維の少なくとも90容量%が1mm以下の長さである請求項1に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

（7）前記コラーゲンの酸化再生セルロースに対する比率が50:50乃至55:45である請求項1に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

（8）前記スポンジの生物担持性（全生存細胞数（TV-C））が100cfu/g以下、好ましくは10cfu/g以下、さらに好ましくは1cfu/g以下である請求項1に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

（9）前記スポンジが5重量%乃至15重量%の水を含有している請求項1に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

（10）前記スポンジの3mmの厚さの層が約15g/100cm<sup>2</sup>乃至20g/100cm<sup>2</sup>の0.9%塩類溶液の無圧縮状態における吸収能力を有している請求項1に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

【0074】（11）前記スポンジが模擬的な生理学的条件下において48時間以上の被吸収時間を有している請求項1に記載の無菌の凍結乾燥処理したスポンジ。

（12）化学的架橋剤を実質的に全く使用することなく行なわれる請求項3に記載の方法。

（13）前記コラーゲンを供給する工程が、ウシの真皮の新鮮で無膨張状態の分離物を供給する工程と、前記真皮分離物を次亜塩素酸塩溶液で処理して微生物活性を阻害する工程と、前記真皮分離物を水酸化ナトリウムおよび過酸化水素を含有する溶液により処理して当該真皮を膨張させて滅菌処理する工程と、前記真皮分離物を10日乃至14日の期間にわたり12以上のpH値および50℃以下の温度において水性アルカリ溶液により処理する工程と、前記真皮分離物を0.8乃至1.2のpH値および50℃以下の温度において水性酸溶液により処理する工程と、前記真皮分離物を洗浄して、当該真皮を十分な水と共に粉砕してペーストを形成する工程とを備えている請求項3に記載の方法。

（14）前記酸化再生セルロース繊維を供給する工程が酸化再生セルロースの布を微粉砕してその微粉砕した粒子をスクリーニングすることにより20μm以下または1000μm以上の粒径を有する粒子を除去する工程を備えている請求項3に記載の方法。

（15）前記コラーゲンおよび酸化再生セルロースを分

散させる工程が、酸膨張処理したコラーゲン／水のペーストを酸性化した水に添加する工程と、酸化再生セルロース繊維を前記酸性化した水に添加する工程と、得られた混合物を均質化する工程とを備えている請求項3に記載の方法。

【0075】(16)前記凍結処理の工程が前記水性分散液を入れたトレイをフリーザーの中の冷却した棚に設置した後に凍結処理が完了するまで $-30^{\circ}\text{C}$ 以下の温度でこのトレイを保持することにより行なわれる請求項3に記載の方法。

(17)前記凍結乾燥処理の工程が熱的脱水架橋処理により行なわれる請求項3に記載の方法。

(18)前記滅菌処理の工程が18KGy乃至29KGyの照射線量におけるガンマ線照射により行なわれる請求項3に記載の方法。

(19)前記コラーゲンの酸化再生セルロースに対する重量比率が50:50乃至55:45であり、前記水性分散液のpH値が2.9乃至3.1である請求項3に記載の方法。

#### 【0076】

【発明の効果】従って、本発明によれば、高い引張強度、極めて高い純度および滅菌度、極めて低い生物担特性、および／または、高い均一性を示すコラーゲン／ORC混合物に基づく生理学的に許容可能な無菌スポンジ・パッドを提供することができる。さらに、本発明によれば、模擬的な生理学的諸条件下において減少した吸収速度、および／または、化学的架橋処理を行うことなく高い機械的強度および長い吸収時間を示すコラーゲン／ORC混合物に基づく生理学的に許容可能な無菌スポンジ・パッドが提供できる。

#### フロントページの続き

(71)出願人 598010953

Erskine House, 68-73 Queen Street, Edinburgh EH2 4NH, United Kingdom

(72)発明者 ウィル・ハーベイ

イギリス国、ビーディー23・3ディーグブリュ スキプトン、カールトン、ウエストウッド 53

(73)発明者 ビーター・ヴァン・ルーウェン

ドイツ国、ハンプルグ、デュヴェンシュテット 22397、ケイケンハイマー・ウェッゲ 105エフ

(72)発明者 トム・ハイランド

イギリス国、エムエル5・1エヌアール、ノース・ラナークシャー、ボートブリッジ、ブレアヒル、マウント・ヴァーノン、アベニュー 3

(72)発明者 ウィル・エイトキン

イギリス国、エイチジー2・9エイチビー、ハログイト、マリソン・クレセント 12

Fターム(参考) 4C058 AA30 BB06 KK01 KK04

4C081 AA02 AA12 CD02 CD12 DA01

DA02 DC13 EA02 EA12